

Aus dem Hygiene-Institut der Universität in Marburg
Direktor: Professor Dr. med. R. Siebert

**Untersuchungen über die Gel-Filtration
gefärbter, serologisch aktiver Polysaccharide
von *Candida albicans* und *tropicalis*
mit Sephadex**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Priebe
aus Berlin

Marburg 1967

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität in Marburg

Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

**Untersuchungen über die Gel-Filtration
gefärbter, serologisch aktiver Polysaccharide
von *Candida albicans* und *tropicalis*
mit Sephadex**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Peter Priebe

aus Berlin

Marburg 1967

Kleinoffsetdruck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 26. 1. 1967

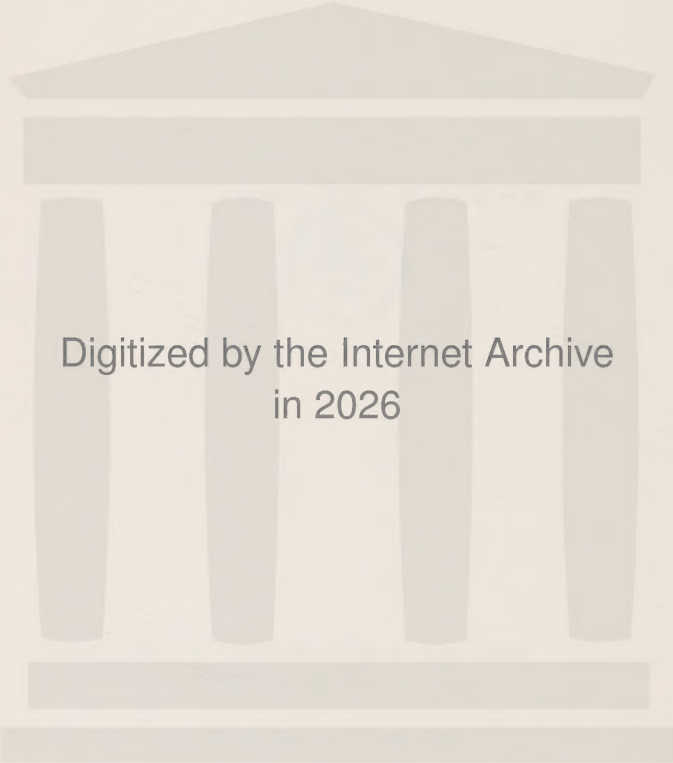
Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Heuser

Referent: Prof. Dr. med. R. Siegert, Hygiene-Institut
der Universität Marburg

Correferent: Dozent Dr. med. W. Schiff, Hygiene-Institut
der Universität Marburg

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Material und Methoden</u>	3
I. Hefestämme und ihre Züchtung	3
II. Antigengewinnung	3
III. Herstellung von Immunseren	4
IV. Immunoелеktrophorese	4
V. Markierung mit Vinylsulfonfarbstoffen	4
VI. Säulenchromatographie	5
1.) Abtrennung des überschüssigen Farbstoffs	5
2.) Auftrennung der Hefe-Polysaccharide	6
C. <u>Ergebnisse</u>	6
I. Gel-Filtration gefärbter Polysaccharide	6
II. Säulenchromatographie der isolierten und gefärbten Hefe-Polysaccharide	8
1.) Reinigung der Zellinhalt-Polysaccharide mit chemischen Methoden	9
a) Entfernung der Eiweiße	9
b) Entfernung der Nukleinsäuren	9
c) Extraktion mit 1,2,2-Trifluor-1,1,2-trichloräthan	10
2.) Reinigung der Zellinhalt-Polysaccharide durch Fällung mit spezifischen Antikörpern	11
3.) Reinigung der Zellwand-Polysaccharide	13
4.) Chromatographie der mit chemischen Methoden isolierten Polysaccharide	13
a) Zellinhalt von Candida tropicalis	13
b) Zellinhalt von Candida albicans	14
c) Zellwände von Candida tropicalis	14
d) Zellwände von Candida albicans	15

5.) Chromatographie der nach Fällung mit spezifischen Antikörpern iso- lierten Polysaccharide	16
III. Nachweis serologisch aktiver Fraktionen mit der Immunelektrophorese	18
1.) Chromatographische Fraktionen der mit chemischen Methoden isolierten Poly- saccharide	18
a) Zellinhalt von Candida tropicalis	18
b) Zellinhalt von Candida albicans	18
c) Zellwände von Candida tropicalis	18
d) Zellwände von Candida albicans	19
2.) Chromatographische Fraktionen der nach Fällung mit spezifischen Antikörpern isolierten Polysaccharide	19
D. <u>Besprechung</u>	22
E. <u>Zusammenfassung</u>	25
F. <u>Literaturverzeichnis</u>	26

A. Einleitung

Die endogenen Mykosen haben in den letzten beiden Jahrzehnten nach Einführung der Antibiotikatherapie deutlich zugenommen (20,25).

In Europa besitzen die Candida-Hefen als Krankheitserreger unter den Pilzen die größte Bedeutung. Außer *Candida albicans*, die lange Zeit als einziger pathogener Vertreter dieser Gruppe galt (9,11,17,22,27,28), sind auch andere Hefe-Arten fakultativ-pathogen befunden worden, wie z.B. *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis* und *C. guilliermondii* (2,8,10,18, 20,24,25). Da die Sproßpilze ubiquitär vorkommen, finden sich häufig auch apathogene Arten im Untersuchungsmaterial. Deshalb ist ihre schnelle und exakte Differenzierung von klinischer Bedeutung.

Die heutigen biochemischen Methoden zur Identifizierung isolierter Hefearten erfüllen zwar die Forderung nach Genauigkeit, benötigen jedoch eine relativ lange Reaktionszeit. Deshalb würde eine Klassifizierung der Isolate mit spezifischen Antisera dem Wunsch der Kliniker nach einer schnelleren Diagnose entgegenkommen.

Die ersten Bemühungen, eine serologische Candida-Differenzierung und -Klassifizierung zu ermöglichen, gehen auf TSUCHIYA zurück (29,30,31). Er gelangte durch Absorption von Candida-Immunsereis mit intakten Hefezellen verschiedener Arten zu einigen monospezifisch reagierenden Seren. Die Antigenformeln, die er hiermit aufstellte, weichen jedoch wesentlich von den Befunden anderer Autoren, z.B. MARTIN (14,15) und POSPISIL (21,22), die andere Methoden verwendeten, ab. Die Aufstellung von Antigenformeln setzt aber voraus, daß zunächst die einzelnen Antigene isoliert und damit monospezifische Antisera hergestellt werden.

Es war deshalb das Ziel dieser Arbeit, Antigene von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* mit Hilfe der Gel-Filtration zu trennen. Hierbei sollte erprobt werden, ob ihre säulenchromatographische Isolierung durch Markierung der serologisch aktiven Polysaccharide mit Remazolfarbstoffen nach BÜRGER und MÜLLER (1) erleichtert wird. Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Lokalisation von Antigenen in Zellwand und Zellinhalt.

B. Material und Methoden

I. Hefestämme und ihre Züchtung

Die in Glattform verwendeten Hefestämme *Candida albicans* CBS 256 (Robin) Berkhout und *Candida tropicalis* CBS 91 (Castellani) Berkhout stammten vom Centralbureau voor Schimmelculturs in Delft.

Die Stämme wurden 48 Stunden bei 30° C auf Sabouraud-Maltose-Agar (Difco) bebrütet, und die Zellrasen mit physiologischer Kochsalzlösung von den Kulturplatten abgeschwemmt.

Nach dem Zentrifugieren der Zellsuspension (15 Minuten, 3000 UpM) folgte dreimaliges Waschen des Sediments mit physiologischer Kochsalzlösung.

II. Antigengewinnung

Das Zellsediment wurde als etwa 25 %-ige Suspension in physiologischer Kochsalzlösung in der Vibrogen-Zellmühle (Firma Bühler, Tübingen) mit Glaskugeln von 0,5 mm Durchmesser homogenisiert (1 Stunde, 3000 UpM).

Das Homogenisat diente als Vollantigen zur Immunisierung von Kaninchen.

Die Trennung von Zellwänden und Zellinhalt beider Hefen erfolgte durch Zentrifugieren (10 Minuten, 1500 UpM). Nach Abpipettieren des Überstands mit dem Zellinhalt wurden die sedimentierten Zellwände dreimal gewaschen.

Zur Gewinnung der Polysaccharide aus den Zellwänden und dem Zellinhalt diente die Phenol-Wasser-Extraktion in der Wärme nach WESTPHAL und Mitarbeitern (32).

III. Herstellung der Immunseren

Mit dem Homogenisat beider Hefen wurden Kaninchen immunisiert, und zwar erfolgte nach einer Blutentnahme am ersten Tag eine Injektion von 0,5 ml. Die i.v.-injizierten Antigenmengen betrugen am zweiten Tag 1 ml, am dritten Tag 1,5 ml sowie am vierten und fünften Tag je 2 ml.

Die letzte Dosis wurde noch sechsmal im Abstand von je einem Tag gespritzt. 5 Tage später wurde eine Probepunktion vorgenommen, der Antikörpertiter mit der Komplementbindungsreaktion bestimmt und die präzipitierende Fähigkeit in der Immunoelektrophorese geprüft.

Bei unzureichender Antikörperbildung mußte nachimmunisiert werden.

IV. Immunoelektrophorese

Die Immunoelektrophorese wurde nach GRABAR und WILLIAMS (5,6), modifiziert nach SCHEIDEGGER (26), in der LKB-Apparatur durchgeführt.

Als Puffer diente der von MICHAELIS (16) angegebene Diaethylbarbitursäurepuffer (Ionenstärke 0,1 M).

Nach Einbringen je eines Tropfens der Antigenlösung in die Stanzlöcher und einstündiger Elektrophorese bei 250 V erfolgte das Auftragen des Immunserums. In Abhängigkeit vom Titer des Serums bildeten sich innerhalb von 24-48 Stunden in der feuchten Kammer die Präzipitationslinien aus. Danach wurden die Objektträger 12 Stunden in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und nach Lufttrocknung mit Amidoschwarz gefärbt.

V. Markierung mit Vinylsulfonfarbstoffen

Zur Markierung der Polysaccharide nach VON DER ELTZ (4) und BÜRGER (1) dienten Farbstoffe mit Vinylsul-

fongruppen, nämlich Remazoltürkisblau G und Remazolrot B.*

2 ml einer etwa 1 %-igen Polysaccharidlösung wurden mit 0,25 ml Farbstofflösung (0,05 g Farbstoff, gelöst in 1 ml Wasser) und 2,5 ml einer alkalischen Lösung (0,33 ml 30 %-ige NaOH und 20 g NaCl, gelöst in 100 ml Wasser) gemischt und 2 Stunden im Wasserbad bei 40° C gehalten.

Die Unterbrechung des Färbeprozesses erfolgte durch Neutralisation mit 0,1 N Schwefelsäure.

VI. Säulenchromatographie

1.) Abtrennung des überschüssigen Farbstoffs

Der überschüssige Farbstoff konnte nach dem Färbeprozess durch Gel-Filtration an Sephadex G 25 (Pharmacia Uppsala, Schweden) von der markierten Substanz getrennt werden. Eine Säule von 30 cm Länge und 2,1 cm Durchmesser wurde mit Wasser gefüllt und mit einem Glaswattestopfen unten verschlossen. Darauf kam eine etwa 1 cm starke Schicht feiner Glaskugeln ($\phi = 0,5 \text{ mm}$).

In Aqua dest. gequollenes und entlüftetes Sephadex G 25 wurde, nach Ablassen des Wassers bis auf 10 cm, in die so vorbereitete Säule eingegossen, bis die Schicht nach dem Sedimentieren eine konstante Höhe beibehielt.

Zur Abdeckung diente Filtrierpapier.

Nach 6- bis 8-stündigem Spülen mit Wasser war die Säule gebrauchsfertig, und die gefärbte Substanz konnte in 3-5 ml-Mengen aufgetragen werden.

Als Elutionsmittel diente Wasser.

* Wir danken den Farbwerken Hoechst AG, Frankfurt/M., für die Überlassung der Remazolfarbstoffe.

Der überschüssige niedermolekulare Farbstoff trennte sich als am langsamsten wandernde Fraktion ab.

2.) Auftrennung der Hefe-Polysaccharide

Säulen von 50 cm Länge und 2,1 cm Durchmesser wurden, wie oben beschrieben, vorbereitet und jeweils mit Sephadex G 50, 75, 100 und 200 gefüllt.

Zur Abdeckung der Gel-Oberfläche diente ein an einem Ende mit einem Sieb und Filter verschlossenes Glasrohr, das bis an die Gel-Oberfläche herangeführt werden konnte.

Das Eluat wurde im Vakuum-Rotationsverdampfer bei 40° C auf 2 ml eingengt und auf die Säulen aufgetragen.

Als Elutionsmittel diente Wasser.

Ein Fraktionssammler fing Portionen von 3 ml auf, deren Farbintensität mit einem Eppendorf-Photometer bei 366 mμ registriert wurde.

C. Ergebnisse

I. Gel-Filtration gefärbter Polysaccharide

Um zu untersuchen, ob eine Trennung g e f ä r b t e r Polysaccharide nach dem Molekulargewicht möglich ist, wurden entsprechende Gemische an Säulen von Sephadex G 50, 75, 100 und 200 chromatographiert. Als Testsubstanzen dienten mit Remazoltürkisblau G oder Remazolrot B markierte Polyaethylenglykole (Molekulargewicht 6000, 4000, 1000, 200), Stärke (Amylum soluble, Merck) und Dextrane (Molekulargewicht 15000-20000 und 60000-90000). Eine eindeutige Trennung nach dem Molekulargewicht konnte jedoch bei diesen Versuchen nicht erzielt werden. Die alleinige Chromatographie gefärbter Stärke an Sephadex G 75 und G 100

zeigte eine sehr breite Bande, die möglicherweise im Gemisch die Trennung anderer mitlaufender Substanzen verdeckt.

In weiteren Säulenläufen wurde deshalb untersucht, ob sich Gemische von gefärbten Polysacchariden ohne Stärke trennen lassen. Dazu wurden Gemische von rotgefärbten höhermolekularen und blaugefärbten niedermolekularen Dextranen oder blaugefärbte höhermolekulare mit rotgefärbten niedermolekularen Dextranen auf Sephadex G 75- und G 100-Säulen aufgetragen.

In jedem Fall zeigte sich eine deutliche Trennung in dem Sinn, daß das höhermolekulare dem niedermolekularen Polysaccharid vorauslief.

Bei Zusatz von Stärke ließ sich jedoch wiederum keine Trennung erreichen, auch dann nicht, wenn das Elutionsmittel geändert wurde.

Als Elutionsmittel dienten neben Wasser 1/15 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 0,1 N Borsäure, 0,9 %-ige Kochsalzlösung und 1/15 M Ammoniumsulfatlösung.

Nachdem in diesen Modellversuchen Sephadex G 100, entsprechend den Molekulargewichten der hier getrennten Stoffe, die beste Auftrennung gezeigt hatte, wurde in der Erwartung höherer Molekulargewichtsbereiche zur Trennung der Pilz-Antigene Sephadex G 200 verwendet.

Die Farbintensität war bei Remazoltürkisblau G stärker als bei Remazolrot B. Deshalb wurde weiterhin nur Remazoltürkisblau G zur Markierung der Polysaccharide benutzt.

Als Elutionsmittel diente Wasser.

II. Säulenchromatographie der isolierten und gefärbten Hefe-Polysaccharide

Die aus den Zellwänden und dem Zellinhalt isolierten Polysaccharide von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* wurden nach den angegebenen Bedingungen mit Remazoltürkisblau G markiert und an Sephadex G 25 vom überschüssigen Farbstoff gereinigt.

Nach dem Einengen des gefärbten Produktes auf 2 ml im Rotations-Vakuum-Verdampfer bei 40° C konnte die Lösung auf eine Sephadex G 200-Säule aufgetragen werden.

Das gewählte Volumen benötigte bis zum vollständigen Eintritt in die oberste Gel-Schicht ca. 10 Minuten. Dann wurde das Gel mit einer 0,5 cm hohen Schicht Wasser bedeckt und nach deren Einsickern die Höhe des Wasserspiegels über der Säule mit einem Flüssigkeitsheber auf 10 cm eingestellt. Die Farbintensität der gesammelten 3 ml-Portionen des Eluats wurde mit dem Eppendorf-Photometer bei 366 mμ bestimmt. Die Untersuchungen ergaben, daß sich die durch Phenol-Wasser-Extraktion gewonnenen wäßrigen Phasen nach Markierung mit Remazoltürkisblau G an Sephadex-Säulen nicht auftrennen lassen.

Da nach WESTPHAL (32) in der wäßrigen Phase außer Polysacchariden auch Nukleinsäuren enthalten sind und, wie die Prüfung mit Sulfosalizylsäure ergab, auch noch Eiweißspuren vorhanden waren - beides Stoffe, die sich ebenfalls mit Vinylsulfonfarbstoffen anfärben lassen - mußte mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß diese Begleitstoffe die Auftrennung verhindern.

Es wurden deshalb Methoden zur Reinigung der Polysaccharide erprobt.

1.) Reinigung der Zellinhalt-Polysaccharide mit chemischen Methoden

a) Entfernung der Eiweiße

10 ml der wäßrigen Phase der Phenol-Wasser-Extraktion wurden mit 1,5 ml 20 %-iger Sulfosalizylsäurelösung (E. Merck, Darmstadt) versetzt, 1 Stunde bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt und anschließend 10 Minuten bei 6000 UpM zentrifugiert, um die gefällten Eiweiße zu entfernen. Vor der sich anschließenden Nukleinsäurefällung mußte die Sulfosalizylsäure aus der Lösung durch etwa 10-stündige Dialyse gegen Aqua dest. in einem Visking-Dialyseschlauch (Dialysis Tubing, Visking Company, Division of Union Carbide Corporation, Chicago, Illinois) entfernt werden, da die beiden Fällungsmittel zusammen unter Salzbildung in Wasser ausfallen.

Um den Endpunkt der Dialyse zu ermitteln, erfolgte wiederholt eine Prüfung des Dialysats mit FeCl_3 . Bei Anwesenheit von Sulfosalizylsäure ergab die entnommene Probe eine Rotfärbung.

b) Entfernung der Nukleinsäuren

10 ml des Dialysats wurden mit 1 ml einer 10 %-igen N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromidlösung versetzt und 1 Stunde bei 4° C aufbewahrt, ehe der Niederschlag durch Zentrifugieren (10 Minuten, 6000 UpM) abgetrennt und verworfen wurde.

Obgleich die Fällungen unter üblichen Bedingungen erfolgten, zeigten sich im Überstand noch Spuren von Eiweiß und Nukleinsäuren. Eine nochmalige Fällung erschien nicht angebracht, da aus der Anthron-Schwefelsäure-Reaktion (3) zu erkennen war, daß bei jeder Fällung auch Polysaccharide

entfernt wurden. Die Prüfung mit der Immuno-
elektrophorese bewies die serologische Akti-
vität dieser Polysaccharide.

Um einen zu großen Antigenverlust zu vermeiden,
wurde auf weitere Fällungen verzichtet und zur
Entfernung der restlichen Eiweiße und Nukleinsäuren die Extraktion mit 1,1,2-Trifluor-1,1,2-trichloraethan nach MARKOWITZ und HENDERSON (13) durchgeführt.

c) Extraktion mit 1,2,2-Trifluor-1,1,2-trichlor-
aethan

Zur Beseitigung des N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-
ammoniumbromids mußte der Überstand mit der 8-
fachen Menge 0,1 M aethylalkoholischer Natrium-
azetatlösung versetzt und das Gemisch 1 Stunde
bei 4° C aufbewahrt werden. Das Nukleinsäure-
Fällungsmittel löste sich im Alkohol. Dann wurde
zentrifugiert (10 Minuten, 6000 UpM), der Nieder-
schlag zur Entfernung des Natriumazetats zweimal
mit Aethanol gewaschen und als etwa 10 %-ige
wäßrige Lösung weiterverarbeitet.

Dabei wurde die Lösung nach der Methode von
MARKOWITZ und HENDERSON (13) mit der gleichen
Menge 1,2,2-Trifluor-1,1,2-trichloraethan homo-
genisiert (3 Minuten), zentrifugiert (15 Minuten,
4500 UpM) und die obere Phase abpipettiert. Zu
dem Rückstand wurde die gleiche Menge Wasser hin-
zugefügt, nochmals homogenisiert und zentrifu-
giert. Nach dem Abpipettieren der oberen Schicht
ist mit dem Rest noch einmal in gleicher Weise
verfahren worden. Hierauf erfolgte die Vereinigung
der wäßrigen Phasen. Bei einer alleinigen Aufar-
beitung mit 1,1,2-Trifluor-1,1,2-trichloraethan -
unter Auslassung der Sulfosalizylsäure- und
N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromidfällung -

erwiesen sich die durch Chromatographie erhaltenen Fraktionen in der Immunoelktrophorese nicht als rein, sondern zeigten eine ausgeprägte Schwanzbildung.

2.) Reinigung der Zellinhalt-Polysaccharide durch Fällung mit spezifischen Antikörpern

Als zweite Reinigungsmöglichkeit der serologisch aktiven Polysaccharide war an die Fällung mit spezifischen Antikörpern zu denken.

Dazu wurden die durch Phenol-Wasser-Extraktion gewonnenen Polysaccharide bzw. Glykoproteide des Zellinhalts von *Candida tropicalis* mit der vierfachen Menge des entsprechenden Antiserums versetzt und zur Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes 2 Tage im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Nach dem Zentrifugieren (15 Minuten, 4000 UpM) erfolgte zweimaliges Waschen des Sediments mit gekühlter physiologischer Kochsalzlösung.

Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde in Glykokoll-Salzsäure-Puffer (7,5 g Glykokoll, 5,85 g NaCl, 36,4 ml, 0,1 N HCl, gelöst in 1 l Wasser) bei pH 2,4 aufgenommen (5), und die eine Hälfte der Lösung der Phenol-Wasser-Extraktion unterzogen. Noch in der wäßrigen Phase verbliebene Eiweißanteile wurden mit 20 %-iger Sulfosalizylsäurelösung während 1 Stunde Kühlschrankaufbewahrung gefällt und durch Zentrifugieren entfernt. Nach 10-stündiger Dialyse gegen Aqua dest. war die Polysaccharidlösung frei von Sulfosalizylsäure (negative Probe mit FeCl_3).

Die zweite Hälfte des in Glykokoll-HCl-Puffer gelösten Antigen-Antikörper-Komplexes wurde, wie unter 1, c) beschrieben, nach MARKOWITZ und HENDERSON (13) mit 1,2,2-Trifluor-1,1,2-trichloraethan extrahiert.

Da es bei der Isolierung der Polysaccharide auf ihre serologische Aktivität ankommt, wurde diese mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion bei den unterschiedlich aufgearbeiteten Antigen-Antikörper-Komplexen geprüft.

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, war die Phenol-Wasser-Extraktion der anderen Aufarbeitungsmethode um ein geringes überlegen.

Tabelle 1

Antigen-verdünnung	Serumtiter, erhalten mit Polysacchariden <u>vor</u> Antigen-Antikörper-Fällung	Serumtiter, erhalten mit isolierten Polysacchariden <u>nach</u> Antigen-Antikörper-Fällung	
		Isolierung der Polysaccharide durch:	
		Phenol-Wasser-Extraktion	Extraktion mit 1,2,2-Trifluor-1,1,2-Trichloräthan
1 : 10	160	160	80
1 : 25	160	160	80
1 : 50	160	160	80
1 : 100	80	80	40
1 : 200	40	40	-

Vergleich der serologischen Aktivität der nach Antigen-Antikörper-Fällung mit verschiedenen Methoden aufgearbeiteten Polysaccharide aus dem Zellinhalt von *Candida tropicalis*.

3.) Reinigung der Zellwand-Polysaccharide

Spuren von Eiweiß und Nukleinsäuren konnten aus den nach der Phenol-Wasser-Extraktion erhaltenen wäßrigen Phasen der Zellwände von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* mit den angegebenen Fällungsmitteln nicht ausgefällt und abzentrifugiert werden. Eine Reinigung wurde deshalb nur durch Extraktion mit 1,2,2-Trifluor-1,1,2-trichloraethan durchgeführt, wie unter 1, c) beschrieben.

4.) Chromatographie der mit chemischen Methoden isolierten Polysaccharide

a) Zellinhalt von *Candida tropicalis*

Die Polysaccharide aus dem Zellinhalt von *Candida tropicalis* wiesen nach etwa einstündigem Lauf in der Sephadex-Säule (G 200) eine deutliche Trennung in 2 Banden auf, wobei die erste nach ca. 3 Stunden etwa doppelt so breit war wie die zweite (Abb. 1).



Fraktion 2

Abb. 1 - *Candida tropicalis*-
chromatographische Auftren-
nung (Sephadex G 200-Säule)
von Polysacchariden des Zell-
inhalts nach Aufarbeitung
mit chemischen Methoden

Fraktion 1

Nach der photometrischen Auswertung der Fraktionen lag das Maximum der ersten Bande in der 19., das der zweiten in der 55. Fraktion.

b) Zellinhalt von *Candida albicans*

Einen ähnlichen Verlauf wies die Chromatographie der Polysaccharide aus dem Zellinhalt von *Candida albicans* auf. Es konnte auch hier eine Trennung in 2 Banden beobachtet werden. Das Maximum der ersten Bande war in der 22., das der zweiten in der 61. Fraktion vorhanden (Abb. 2).

c) Zellwände von *Candida tropicalis*

Schon nach der Säulen-Chromatographie von einer halben Stunde zeigten die Polysaccharide aus den Zellwänden von *Candida tropicalis* die scharfe Abtrennung einer Bande vom Eluat. Das Maximum der ersten Bande ließ sich photometrisch in der 22., das der zweiten in der 59. Fraktion ermitteln (Abb. 3).

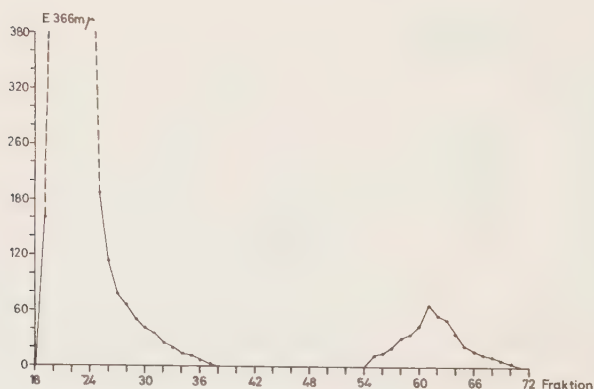


Abb. 2 - *Candida albicans* - photometrische Auswertung der Fraktionen, die nach der chromatographischen

Auftrennung (Sephadex G 200) von Polysacchariden
des Zellinhalts erhalten wurden.

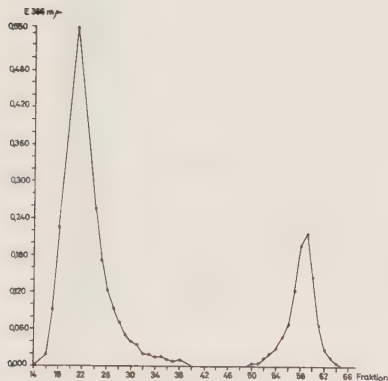


Abb. 3 - *Candida tropicalis* - photometrische Auswertung der Fraktionen, die nach der chromatographischen Auftrennung (Sephadex G 200) von Zellwand-Polysacchariden erhalten wurden.

d) Zellwände von *Candida albicans*

Die Chromatographie der Polysaccharide aus den Zellwänden von *Candida albicans* ergab ebenfalls eine Trennung in 2 Banden, deren Maxima sich in der 23. und 67. Fraktion vorfanden. Mit Hilfe der photometrischen Messung konnte unmittelbar nach dem ersten Intensitätsmaximum ein zweiter Gipfel ermittelt werden (Abb. 4).

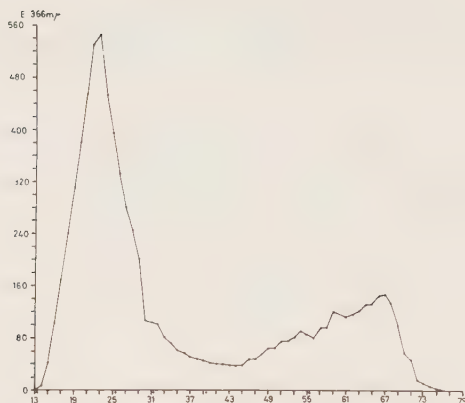


Abb. 4 - *Candida albicans* - photometrische Auswertung der Fraktionen, die nach der chromatographischen Auftrennung (Sephadex G 200) von Zellwand-Polysacchariden erhalten wurden.

5.) Chromatographie der nach Fällung mit spezifischen Antikörpern isolierten Polysaccharide

Bei der Gel-Filtration konnte hier zunächst eine Trennung in 2 Banden beobachtet werden, während sich nach etwa 3 Stunden eine dritte dazwischen abzeichnete (Abb. 5).

Entsprechend den 3 Banden ergab die photometrische Messung der Fraktionen 3 Intensitätsmaxima, die sich in der 18., 27. - 28. und 52. Fraktion befanden (Abb. 6).

Im Durchschnitt betrug die Gesamtdurchlaufszeit des Eluats bei allen Versuchen 12 - 14 Stunden, wobei sich das Elutionsvolumen auf etwa 200 ml belief.

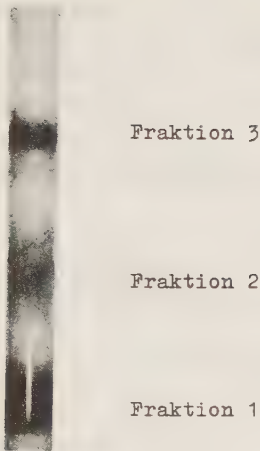


Abb. 5 - *Candida tropicalis* - chromatographische Auftrennung (Sephadex G 200-Säule) von Polysacchariden des Zellinhalts. Aufarbeitung des Antigen-Antikörper-Präzipitats.

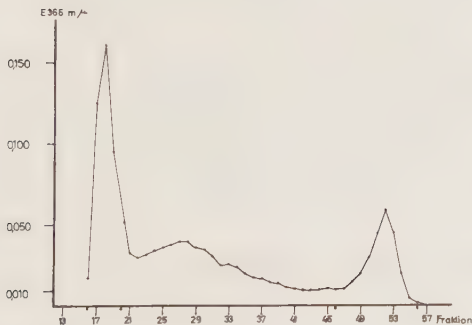


Abb. 6 - *Candida tropicalis* - photometrische Auswertung der Fraktionen, die nach der chromatographischen Auftrennung (Sephadex G 200) von Polysacchariden des Zellinhalts erhalten wurden.

III. Nachweis serologisch aktiver Fraktionen mit der Immunelektrophorese

Die den Banden an der Säule entsprechenden, gefärbten Fraktionen wurden auf etwa gleiche Farbtintensität eingeeengt und mit der Immunelektrophorese gegen Anti-Candida-Seren ausgewertet.

1.) Chromatographische Fraktionen der mit chemischen Methoden isolierten Polysaccharide

a) Zellinhalt von Candida tropicalis

Die bei der Chromatographie der Polysaccharide aus dem Zellinhalt von Candida tropicalis gewonnenen Fraktionen wiesen in der Immunelektrophorese eine serologische Aktivität auf, und zwar ergab die erste Fraktion auf dem Agar-Objektträger 3 Präzipitationslinien, während die zweite Fraktion eine reine Determinante gemäß einer Präzipitationslinie darstellte (Abb. 9, oben).

b) Zellinhalt von Candida albicans

Auch die chromatographischen Fraktionen der Polysaccharide aus dem Zellinhalt von Candida albicans waren serologisch aktiv, wobei die zweite Fraktion wieder eine reine Determinante ergab. Die erste Fraktion enthielt 3 präzipitierende Spezifitäten.

c) Zellwände von Candida tropicalis

Die aus den Polysacchariden der Zellmembranen von Candida tropicalis gewonnenen chromatographischen Fraktionen erwiesen sich ebenfalls als serologisch aktiv.

Die erste Fraktion bestand aus 3 Determinanten und war entsprechend den ersten Fraktionen aus dem Zell-

inhalt von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* nicht als reines Antigen anzusehen.

Die der zweiten Bande entsprechende Fraktion zeigte ebenfalls eine reine Präzipitationslinie.

d) Zellwände von *Candida albicans*

Ein ähnliches Verhalten, wie unter c) beschrieben, konnte bei der immunoelektrophoretischen Untersuchung der chromatographischen Fraktionen aus den Polysacchariden der Zellmembranen von *Candida albicans* beobachtet werden. Die erste Fraktion erwies sich als serologisch aktiv, aber als nicht einheitlich, während die zweite eine scharfe Präzipitationslinie bewirkte. Hier ergab auch das unmittelbar nach der ersten Fraktion mit der photometrischen Messung ermittelte Intensitätsmaximum eine reine Präzipitationslinie. Diese Fraktion kann ebenfalls als einheitlich angesehen werden.

2.) Chromatographische Fraktionen der nach Fällung mit spezifischen Antikörpern isolierten Polysaccharide

Bei den nach der Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes aufgearbeiteten Polysacchariden aus dem Zellinhalt von *Candida tropicalis* zeigten die 3 chromatographischen Fraktionen in der Immunoelektrophorese serologische Aktivität.

Die erste und zweite Fraktion wiesen 3 sich entsprechende Präzipitationslinien auf, zudem war bei der zweiten Fraktion zusätzlich noch eine vierte Bande zu erkennen (Abb. 7,8).

Die dritte Fraktion ergab als reine Determinante eine einzige Präzipitationslinie (Abb. 8,9).

Die aus dem Zellinhalt von *Candida tropicalis* durch Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplexes oder durch Fällungsmethoden isolierten reinen Antigene zeigten in der Immunoelktrophorese eine korrespondierende Lokalisation, so daß sie als identisch angesehen werden können.

Die aus dem Zellinhalt von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* gewonnenen reinen Determinanten wiesen auf dem Agar-Objektträger eine unterschiedliche Lokalisation auf, und zwar zeigte das isolierte *Candida-albicans*-Antigen eine etwas geringere Wanderungsgeschwindigkeit als die aus *Candida tropicalis* isolierte Determinante.

Immunoelktrophorese von an Sephadex G 200 chromatographierten Zellinhalt-Polysacchariden von *Candida tropicalis* gegen ein homologes Antiserum:

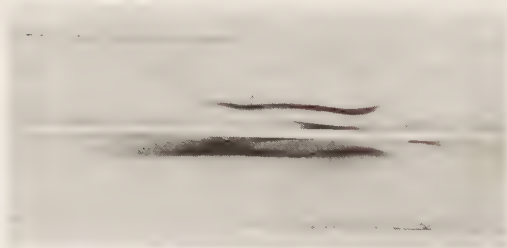


Abb. 7 - oben: Chromatographische Fraktion 1
unten: Chromatographische Fraktion 2
Aufarbeitung des Antigen-Antikörper-
Präzipitats.



Abb. 8 - oben: Chromatographische Fraktion 1
unten: Chromatographische Fraktion 3
Aufarbeitung des Antigen-Antikörper-
Präzipitats.

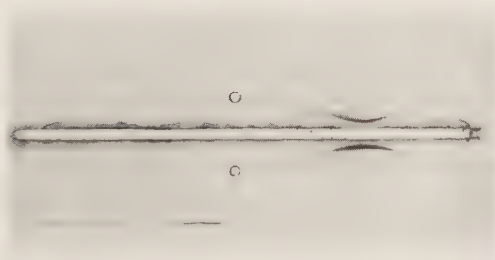


Abb. 9 - oben: Chromatographische Fraktion 2
Aufarbeitung ohne Antigen-Antikörper-
Präzipitation.
unten: Chromatographische Fraktion 3
Aufarbeitung des Antigen-Antikörper-
Präzipitats.

D. Besprechung

Nach den Angaben von WESTPHAL und Mitarbeitern (32) enthält die wäßrige Phase nach der Phenol-Wasser-Extraktion von Bakterien nur Polysaccharide und Nukleinsäuren. Bei der entsprechenden Aufarbeitung des Zellinhalts von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* konnten zusätzlich noch Eiweißspuren nachgewiesen werden.

Es galt, eine Methode zu finden, diese störenden Begleitstoffe zu entfernen, da auch Eiweiß und Nukleinsäuren mit Remazolfarbstoffen markiert werden können. An der nach der Phenol-Wasser-Extraktion in der Wärme erhaltenen wäßrigen Phase des Zellinhalts von *Candida tropicalis* wurden zwei Möglichkeiten der Entfernung des Eiweißes und der Nukleinsäuren erprobt. Dabei erwies sich die Fällung der serologisch aktiven, gefärbten Polysaccharide durch hochwertige Immunsereen als besonders geeignet. Jedoch muß noch eine Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes auf chemischem Wege angeschlossen werden.

Die angewandte chemische Methode zur Reinigung der Polysaccharide führte zu einem Antigenverlust durch die notwendig gewordenen Eiweiß- und Nukleinsäurefällungen, bei denen nachweislich ein Teil der serologisch aktiven Polysaccharide mitgefällt werden. Beide Isolierungsarten, die serologische und die chemische, führen zu reinen Polysaccharidgemischen, die eine chromatographische Trennung ermöglichen. Die chemische Aufarbeitung hat den Nachteil, aufwendig zu sein und einen Antigenverlust zu erleiden, während die serologische relativ große Mengen hochtitriger Seren benötigt.

Wie die Versuche zeigen, läßt sich nach Entfernung der Fremdstoffe aus den Polysaccharidgemischen durch

Gel-Filtration an Sephadex G 200 aus den Zellwänden und dem Zellinhalt von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* jeweils ein serologisch aktives Polysaccharid darstellen, das sich in der Immunoelktrophorese als serologisch einheitlich erweist.

Da die Polysaccharide eine schlechte Wanderung im elektrischen Feld zeigen, ist mit der elektrophoretischen Methode nicht der Beweis zu erbringen, ob es sich tatsächlich, wie vermutet, um ein einzelnes Antigen handelt. Bewiesen werden kann seine Einheitlichkeit, wenn das "Einzelantigen" zur Immunisierung verwendet wird und sich dann tatsächlich nur ein monospezifischer Antikörper gegen ein einziges Antigen nachweisen läßt.

Die aus den Zellwänden und dem Zellinhalt jeder Hefe unter den gegebenen Bedingungen isolierten Antigene entsprechen sich in ihrer Lokalisation auf dem Agar-Objektträger. Es ist also zu vermuten, daß aus Zellinhalt und Zellwänden dasselbe Antigen isoliert wurde.

Dagegen zeigen die aus *Candida albicans* und *Candida tropicalis* isolierten Antigene eine verschiedene Lokalisation in der Immunoelktrophorese. Damit ist aber noch keinesfalls bewiesen, daß es sich um unterschiedliche Antigene handelt. Möglicherweise ist die gleiche Spezifität bei den beiden Hefen an Träger mit verschiedenen Molekulargewichten gebunden, so daß sich daraus unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten ergeben. Auch diese Frage ist nur immunologisch mit monospezifischen Antiseren zu klären.

Nach Befunden von MÜLLER und HIRSCH (19), die *Candida albicans* und *Candida tropicalis* mit der Agar- und Immunoelktrophorese untersuchten, wandert die Masse der Antigene nur geringfügig zur Kathode, während eine weit nach der Kathode wandernde Fraktion den hier isolierten Antigenen zu entsprechen scheint.

Auch TRAN van KY, BIGUET und ANDRIEU (12) versuchten, aus *Candida albicans* Einzelantigene zu gewinnen. Sie benutzten dazu den Ionenaustauscher Amberlite XE 64 und erhielten ein Einzelantigen, das nach ihren Versuchen für *Candida albicans* spezifisch sein soll. Dieses Antigen bildet in der Immunoelktrophorese eine Präzipitationslinie am Auftragspunkt. Immunisierungsversuche wurden nicht gemacht, so daß auch bei diesem Antigen die Frage offenbleibt, ob es sich wirklich um ein Einzelantigen handelt. Die Lokalisation in der Immunoelktrophorese und die Kreuzreaktionen unseres durch Gel-Filtration gewonnenen Antigens mit Anti-*Candida albicans*- und Anti-*Candida tropicalis*-Serum deuten darauf hin, daß es nicht mit dem von van KY identisch ist.

E. Zusammenfassung

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, serologisch aktive Polysaccharidgemische von *Candida albicans* und *Candida tropicalis* nach dem Molekulargewicht säulenchromatographisch aufzutrennen mit dem Ziel, reine Antigene zu isolieren.

Um die Trennung der Polysaccharide sichtbar zu machen, wurden sie mit Remazolfarbstoffen markiert. Es zeigte sich, daß die aus Zellinhalt und Zellwand isolierten Polysaccharide nach der Phenol-Wasser-Extraktion für eine chromatographische Auftrennung noch zu viele Ballaststoffe, wie Nukleinsäuren und Eiweiße, enthalten. Deshalb ließ sich diese Markierungsmethode nur bei gereinigten Substanzen anwenden. Es wurde auf 2 verschiedenen Wegen versucht, die serologisch aktiven Polysaccharide rein darzustellen. Die eine Methode bestand darin, sie zunächst durch Antikörper zu fällen und dann auf chemischem Wege wieder zu isolieren, die andere in mehreren aufeinanderfolgenden Fällungsreaktionen. Beide Aufarbeitungen bedingen allerdings einen Antigenverlust, führen aber zu reinen Polysacchariden, die sich mit Remazolfarbstoffen markieren lassen.

Aus diesen gereinigten und gefärbten Polysaccharidgemischen ließ sich durch Gel-Filtration an Sephadex G 200 eine serologisch aktive Determinante jeweils aus Zellmembranen und Zellinhalt gewinnen, die sich in der Immunelektrophorese als Einzelantigen darstellte. Ob diese Antigene beider Hefen identisch sind, wird sich erst dann ergeben, wenn es gelungen ist, Antikörper damit zu induzieren.

F. Literaturverzeichnis

- (1) BÜRGER, H. und H.-L. MÜLLER: Markierung von antigenen Hefepolysacchariden mit Vinylsulfonfarbstoffen.
Z. Naturwissensch. 19, (1964) 463
- (2) CONN, N. K., CREAN, G. P., MACCABE, A. F. and MACLEAN, N.: Systemic Candidiasis and Endocarditis due to *C. tropicalis*.
Brit. Med. J., I, (1959), 944-947
- (3) DISCHE, Z.: General Color Reactions: The Anthrone-Sulfuric Acid Reaction, 479. In "Methods in Carbohydrate Chemistry I"; Hrsg. WHISTLER, R. L. und M. L. WOLFROM. Academic Press, New York and London 1962
- (4) VON DER ELTZ, H. U. und K. WAGNER: Das Einbad-Klotz-Aufdock-Verfahren für Remazolfarbstoffe
SVF-Fachorgan 16, (1961), 320-340
- (5) GRABAR, P. et C.A. WILLIAMS: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange des protéines. Application au sérum sanguin. Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 10, (1953), 193-194
- (6) GRABAR, P. et C. A. WILLIAMS: Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.
Biochim. biophysica Acta 17, (1955), 64-74

- (7) GRAMLICH, F., MOHRING, D. und H. E. MÜLLER:
Die Reindarstellung von Antikörpern durch
Gel-Filtration.
Z. Naturwissensch. 49, (1962), 451

- (8) HIEDA et al.: zit. nach DONOMAE, I., TAKAHASHI,
H. and F. TSUBURA: Incidence of Candidiasis in
Japan. In "Studies on Candidiasis in Japan",
Research Committee of Candidiasis, Education
Ministry of Japan, (1961), 1-11

- (9) HIGUCHI, K. and H. IWASAKI: Systemic Candidiasis
complicated with Leukaemia.
In "Studies on Candidiasis in Japan", Research
Committee of Candidiasis, Education Ministry
of Japan, (1961), 176-182

- (10) KITAMURA, K., FUKUSHIMA, R., KAGAWA, S.,
NISHIYAMA, S. and H. TAKAHASHI: Black hairy
tongue.
In "Studies on Candidiasis in Japan", Research
Committee of Candidiasis, Education Ministry
of Japan, (1961), 157-171

- (11) KLOSE, F. und R. SCHÜRMANN: Experimentelle
Untersuchungen über Soormykose.
Z.Hyg. 134, (1952), 63-77

- (12) VAN KY, T., BIGUET, J. et S. ANDRIEU:
Isolement chromatographique d'une fraction
antigénique spécifique de *Candida albicans*.
Compt. Rend. Acad. Sci. 253, (1961), 2288-2290

- (13) MARKOWITZ, A. S. und J. S. HENDERSON: A rapid
and specific method for the isolation of
Pneumococcal Polysaccharide.
Nature 181, (1958), 771-772

- (14) MARTIN, D. S.: Studies on the immunologic relationships among various species of the Genus *Candida* (Monilia)
Amer. J. Trop. Med. 22, (1942), 295-307

- (15) MARTIN, D. S., JONES, C. P., YAO, K.F. and L. E. LEE: A practical classification of the Monilias.
J. Bact. 34, (1937), 99-123

- (16) MICHAELIS, L.: Der Acetat-Veronal-Puffer
Biochem. Z. 234, (1931), 139-141

- (17) MIYAKE, M., AKIBA, T., OKUDAIRA, M. and S. INOUE: An immuno-pathologic study on deep-seated Candidiasis, especially on the precipitin-reaktion using the infected tissue as antigen.
In "Studies on Candidiasis in Japan", Research Committee of Candidiasis, Education Ministry of Japan, (1961), 84-108

- (18) MIZUNO, S.: Problem of mixed infection in relation to *Candida*.
In "Studies on Candidiasis in Japan", Research Committee of Candidiasis, Education Ministry of Japan, (1961), 194-199

- (19) MÜLLER, H.-L., SIEGERT, R. und M. HIRSCH: Zur Antigenstruktur von *Candida albicans* und *tropicalis*.
4. Mitteilung. Immunoelktrophoretische Antigenstudien an Zellmembranen und Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I Orig., in Vorbereitung

- (20) POLEMANN, G.: Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten.
Thieme-Verlag, Stuttgart 1961

- (21) POSPISIL, L.: zit. nach (30)
- (22) POSPISIL, L.: Zur Serologie der mykotischen Erkrankungen.
Zbl. Bakt. I Orig. 163, (1955), 407-409
- (23) RALPH, R. K. and A. R. BELLAMY: Isolation and purification of undegraded Ribonucleic Acids.
Bioch. Biophys. Acta 87, (1964), 9-16
- (24) RÖTTER, W. und F. STAIB: Candida-tropicalis-Pneumonie.
Dtsch. med. Wschr. II, (1958), 2285-2288
- (25) SCHABINSKI, G.: Grundriß der Medizinischen Mykologie.
VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena 1960
- (26) SCHEIDEGGER, J. J.: Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse.
Int. Arch. Allergy 7, (1955), 103-110
- (27) SEELIGER, H.P.R.: Mykologische Serodiagnostik.
Johann-Ambrosius-Barth-Verlag, Leipzig 1958
- (28) STRAUBE, W., HAHN, W. und H.P.R. SEELIGER:
Zur Klinik und Therapie von Soormykosen der Lunge.
Dtsch. med. Wschr. I, (1955), 753-755
- (29) TSUCHYA, T., MIYASAKI, F. and Y. FUKAZAWA:
Studies on the classification of the Genus Candida II.
Jap. J. Exp. Med. 25, (1955), 15-21

- (30) TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y., MIYASAKI, F. and S. KAWAKITA: Studies on the classification on Genus Candida III.
Jap. J. Exp. Med. 25, (1955), 75-83
- (31) TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y. and S. KAWAKITA: Serological classifications of the Genus Candida.
In "Studies on Candidiasis in Japan", Research Committee of Candidiasis, Education Ministry of Japan, (1961), 34-46
- (32) WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. und F. BISTER: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol-Wasser.
Z. Naturforsch. 7 b, (1952), 148-155

Herrn Prof. Dr. med. R. Siegert, dem Direktor des Hygiene-Instituts, danke ich für die Überlassung des Themas und Arbeitsplatzes sowie für viele Anregungen.

Frau Dr. med. H.-L. Müller und Herrn Dr. med. Dipl. chem. H. Bürger habe ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihren fachlichen Rat bei der Durchführung der Versuche sehr zu danken.

Lebenslauf

Als Sohn des Kaufmanns Günther Priebe und seiner Ehefrau Ida, geb. Kühl, wurde ich, Peter Klaus Priebe, am 17. 5. 1939 in Berlin geboren.

Am 23. 2. 1959 legte ich an der Hermann-Billung-Schule in Celle die Reifeprüfung ab.

Vom 1. 4. 1959 bis zum 31. 3. 1961 arbeitete ich als Apothekerpraktikant in der Löwen-Apotheke zu Wathlingen/Celle. Das pharmazeutische Vorexamen bestand ich am 6. 3. 1961 in Lüneburg.

Im Sommersemester 1961 begann ich mein Medizinstudium an der Universität Tübingen, wo ich am 13. 4. 1962 das Vorphysikum ablegte.

An der Universität Hamburg setzte ich im Wintersemester 1962/63 das Studium fort. Das Physikum bestand ich am 23. 10. 1963.

Im Sommersemester 1964 immatrikulierte ich mich an der Universität Marburg. Hier legte ich am **21. 12. 1966** mein Staatsexamen ab.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

in Tübingen

Barbey, Brecht, Feneis, Krüger, Möhres, Mörike,
Müller, Nultsch, Rüdorff, Tonutti, Weizel;

in Hamburg

Bettendorf, Bleichert, Budelmann, Draeger, Ehrengut,
Harders, Harmsen, Horstmann, Krauspe, Kühnau, Lierse,
Maass, Reichel, Roemer, Seelemann, Tiedemann, Wartenberg;

in Marburg

Berendes, Bommer, Braun-Falco, Buchholz, Exner, Franke,
Gedigk, Hamm, Hildebrandt, Heuser, Jacob, Lang, Linneweh,
Mann, Martini, Marx, du Mesnil de Rochemont, Rodeck,
Rohen, Sauer, Schiff, Schmid, Schleyer, Schwaiger,
Siegert, Siess, Straub, Streicher, Würterle.

